

## Simultane radioimmunologische Bestimmung von Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ) im Urin<sup>1)</sup>

Von J. Habermann, K. Horn

II. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn) der Universität München

G. Ulbrecht

Abteilung III des Flugmedizinischen Instituts der Luftwaffe, Fürstenfeldbruck

und P. C. Scriba

II. Medizinische Klinik der Universität München

(Eingegangen am 23. Juni/28. September 1976)

**Zusammenfassung:** Eine radioimmunologische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ) im Urin wurde entwickelt. Die Extraktion der Proben, die Inkubationen mit  $T_3$ - und anschließend  $T_4$ -Antikörper und die Elutionen der jeweiligen gebundenen Fraktionen wurden alle nacheinander auf der gleichen Sephadex Säule durchgeführt. Mit diesem Prinzip wurden gleichzeitig bis zu 120 Bestimmungen durchgeführt. Die Interassay-Variationskoeffizienten betrugen 20,1% für  $T_3$  und 10,6% für  $T_4$ . Die Wiederfindung von Urinproben zugesetzten Kalibrierstandards war  $107 \pm 8\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ) für  $T_3$  und  $102 \pm 8\%$  für  $T_4$ .

Im 24-Stunden-Urin gesunder Kontrollpersonen wurden  $1,70 \pm 0,40 \mu\text{g } T_3$  und  $1,44 \pm 0,51 \mu\text{g } T_4$  gefunden ( $\bar{x} \pm s$ ;  $N = 20$ ). Drei-Stunden-Fractionen des Tagesurins zeigten signifikant höhere Werte der  $T_4$ -Ausscheidung im Vergleich zur Nacht-Fraktion, während die  $T_3$ -Exkretion nur in der Abend-Periode von 18–21 Uhr höher als während der übrigen Beobachtungszeit war. Die  $T_4$ -Ausscheidung ist bei der primären Hypothyreose erniedrigt ( $0,48 \pm 0,47 \mu\text{g}/24$  Stunden,  $p < 0,0005$ ), wobei die  $T_3$ -Ausscheidung als Zeichen der bekannten  $T_3$ -Restsekretion nur geringfügig vermindert war ( $1,30 \pm 0,80 \mu\text{g}$ ). Eine verminderte  $T_4$ -Ausscheidung ( $0,85 \pm 0,34 \mu\text{g}$ ,  $p < 0,0005$ ) im Gegensatz zu der normalen  $T_3$ -Exkretion weist bei Patienten mit endemischer Struma auf die bekannte präferentielle  $T_3$ -Sekretion bei Jodmangel hin. Bei  $T_3$ -Hyperthyreose fand sich eine erhöhte  $T_3$ -Exkretion bei normaler  $T_4$ -Ausscheidung im Urin. Bei persistierender Suppression der TSH-Werte im Serum nach erfolgreicher Behandlung einer Hyperthyreose fanden sich normale Werte der  $T_3$ - und  $T_4$ -Ausscheidung im Urin.

### *Simultaneous radioimmunoassay for urinary thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ )*

**Summary:** A radioimmunoassay for the determination of thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ) in urine was developed. The extraction of a sample, the incubations with  $T_3$ - and subsequently  $T_4$ -antibody and the elutions of the respective bound fractions are performed all on the same Sephadex column. This principle can be applied to as many as 120 simultaneous determinations. The interassay coefficients of variation were 20.1% for  $T_3$  and 10.6% for  $T_4$ , respectively. The recovery of standards added to urine was  $107 \pm 8\%$  (mean  $\pm$  SD) for  $T_3$  and  $102 \pm 8\%$  for  $T_4$ .

The 24 h collections of urine from healthy controls contained  $1.70 \pm 0.40 \mu\text{g } T_3$  and  $1.44 \pm 0.51 \mu\text{g } T_4$  (mean  $\pm$  SD,  $N = 20$ ). Three hourly fractions of the urinary excretion collected from 6 a. m. through 9 p. m. showed a significant ( $p < 0.005$ ) elevation of the  $T_4$  excretion as compared to the night fraction, whereas an increased  $T_3$  excretion was only observed from 6–9 p. m. The  $T_4$  excretion was reduced in primary hypothyroidism ( $0.48 \pm 0.47 \mu\text{g}$  per 24 h,  $p < 0.0005$ ), whereas the  $T_3$  excretion was not that markedly reduced ( $1.30 \pm 0.80 \mu\text{g}/\text{d}$ ), pointing to the known residual  $T_3$  secretion. A reduced  $T_4$  excretion ( $0.85 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{d}$ ,  $p < 0.0005$ ) contrasted with the normal  $T_3$  excretion in patients with endemic goiter, indicating the known preferential  $T_3$  secretion in iodine deficiency states.  $T_3$  thyrotoxicosis was accompanied by an elevated  $T_3$  excretion with normal urinary  $T_4$ . Normal excretion of  $T_4$  and  $T_3$  were observed in patients with persistently suppressed serum TSH levels after successful treatment for hyperthyroidism.

<sup>1)</sup> Mit Unterstützung des Bundesministeriums der Verteidigung (InSan I-2474-V-083).

## Einleitung

Die beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ) zirkulieren im Blut zu über 99% an Serumproteine gebunden, vor allem an das Thyroxin-bindende Globulin (TBG). Diese proteingebundenen Schilddrüsenhormone sind als ein metabolisch nicht direkt aktives Reservoir aufzufassen. Die Schilddrüsen-funktionslage wird daher prinzipiell nicht vom Gehalt an  $T_4$  und  $T_3$  im Serum bestimmt, sondern von den Konzentrationen und Umsatzraten der freien Schilddrüsenhormone. Die konventionellen Hormonbestimmungen (1) messen jedoch den gesamten Hormongehalt und somit vor allem die biologisch nicht direkt wirksame Form. Der prozentuale freie Anteil wird indirekt durch Bindungsteste (z. B.  $T_3$ U) oder Dialyseverfahren (2) beurteilt. Ein einfacher Parameter für die absoluten freien Konzentrationen der Schilddrüsenhormone könnte deren Ausscheidung im Urin darstellen, vorausgesetzt, daß bei normaler Nierenfunktion nur das ungebundene Hormon glomerulär filtriert werden kann und nicht zusätzliche tubuläre Sekretions- oder Rückresorptionsphänomene interferieren (3, 4). Dabei bietet die Urinbestimmung den üblichen Vorteil, kurzfristige Veränderungen zu integrieren.

In der vorliegenden Arbeit wird die Bestimmung von  $T_4$  und  $T_3$  im Urin radioimmunologisch durchgeführt, da eine erhebliche Kreuzreaktion von  $T_3$  in der  $T_4$ -Bestimmung mit kompetitiver Proteinbindungsanalyse gefunden wurde (3). Durch säulenchromatographische Extraktion (5) der Schilddrüsenhormone aus dem Urin sollten

1. der störende Einfluß selbst einer geringen Proteinurie auf den Nachweis (3) und
2. eine mögliche Interferenz von Glucuroniden der Schilddrüsenhormone (6) eliminiert werden.

## Material und Methode

**Radioaktives L-Thyroxin**  $^{125}\text{Jod}$  ( $^{125}\text{J}T_4$ ) und **L-Trijodthyronin**  $^{125}\text{Jod}$  ( $^{125}\text{J}T_3$ ), spezifische Aktivität 100 mCi/mg  $T_4$  bzw. 500 mCi/mg  $T_3$  (Fa. Hoechst, Frankfurt/M.) wurden jeweils mit 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 2 g/l  $\gamma$ -Globulin (Intraglobin, Fa. Biotest, Frankfurt/M., zur Verhinderung der Wandadsorption), 0,2 g/l Natriumazid (Fa. Merck, Darmstadt) zu einer Standardlösung von 14,8 MBq/l (0,4 mCi/l) verdünnt.

**Stabiles L-Thyroxin und L-Trijodthyronin** (RIA-Standardreagens He 13.12 und He 14.12, Fa. Henning, Berlin) wurden in 0,5 ml 0,1 mol/l NaOH gelöst und mit 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 5 g/l  $\gamma$ -Globulin, 0,2 g/l Natriumazid zu einer  $T_4$ - bzw.  $T_3$ -Standardlösung von 100  $\mu\text{g/l}$  verdünnt. Diese Standardlösungen wurden bis zum Gebrauch bei  $-17^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**$T_3$ -Antiserum** (Batch 6 i-sw) bzw.  **$T_4$ -Antiserum** (Batch K<sub>9</sub> IV, Fa. Henning, Berlin) wurden in einer Verdünnung von 1:100 in 0,05 mol/l Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 2,5 g/l Rinderalbumin (Pentex, Fa. Roth, Karlsruhe), 0,2 g/l Natriumazid in kleinen Portionen bei  $-17^\circ\text{C}$  tiefgefroren bis zur Verwendung aufbewahrt.

**Polyvinylpyrrolidon-Lösung:** 25 g/l Polyvinylpyrrolidon K<sub>30</sub> (Fa. Roth, Karlsruhe) in 0,05 mol/l NaOH, 0,075 mol/l NaCl.

**Natriumphosphat-EDTA-Puffer pH 7,4:** 12 g Di-Natriumphosphat und 6 g Di-Natrium-EDTA (Fa. Merck, Darmstadt) wurden in einem Liter bidest. Wasser gelöst.

**Lagerung:** Die Urinproben wurden ohne Zusatz möglichst bald nach Abschluß der Sammelzeit in Einmalgefäßen bei  $-17^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

## Prinzip der Methode

Die Methode beruht auf einem „solid phase“-Radioimmunoassay, wobei das an Sephadex adsorbierte Hormon die feste Phase darstellt. Durch Auftragen der Proben auf alkalisierte Sephadex-Säulen werden die Schilddrüsenhormone extrahiert und an Sephadex adsorbiert (5). Von den Säulen werden mit Natriumphosphat-EDTA-Puffer pH 7,4 Proteine, Glucuronide und Salze eluiert. Anschließend wird zunächst die  $T_3$ -Antikörperlösung aufpipetiert; die Antigen-Antikörperreaktion erfolgt direkt auf der Säule. Der Antikörper-gebundene Anteil des  $T_3$  wird mit Natriumphosphat-EDTA-Puffer eluiert, der freie Anteil bleibt an Sephadex adsorbiert. Nach Auftragen von  $T_4$ -Antikörperlösung wird dann die  $T_4$ -Bestimmung analog zum  $T_3$ -Nachweis durchgeführt. Somit können die beiden Schilddrüsenhormone  $T_3$  und  $T_4$  einer Probe auf einer einzigen Säule bestimmt werden.

## Methodik

### Säulenpräparation

5 ml-Einmalspritzen mit zentralem Auslauf (Fa. Terumo, Japan, über Fa. Sartorius, Göttingen) werden mit 2 ml Sephadex G-25 fine (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) gefüllt. Der Auslauf der Spritzen wird vorher mit einem feinporigen Membranfilter (SM 13400, Fa. Sartorius, Göttingen) verschlossen, die Geloberfläche mit einer Kunststoffritze stabilisiert.

### Praktische Durchführung der parallelen Säulenchromatographie

Am Arbeitstag wird ein Tracergemisch aus 4 ml  $^{125}\text{J}T_3$ -Standardlösung und 4 ml  $^{125}\text{J}T_4$ -Standardlösung sowie 5 ml 1,0 mol/l NaOH hergestellt. Gleichzeitig werden die Standardlösungen der stabilen Schilddrüsenhormone zu gleichen Teilen gemischt und mit 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,6 auf die Endverdünnungen der Kalibrierlösungen (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125  $\mu\text{g/l}$   $T_3$  und  $T_4$ ) gebracht. Ferner werden die Antiseren mit 0,05 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,6 zur Gebrauchskonzentration weiterverdünnt ( $T_3$ -Antiserum 1:25000,  $T_4$ -Antiserum 1:6000).

Die Säulen (Abb. 1) werden mit 0,15 mol/l NaCl in 0,05 mol/l NaOH alkalisiert und nach Einsinken des Überstandes der Säulenauslauf dicht verschlossen. Dann werden 0,3 ml Urinprobe bzw. Kalibrierlösung von  $T_3$  und  $T_4$  auf die Säulen pipettiert und 0,1 ml alkalisiertes Gemisch von  $T_3$ - und  $T_4$ -Tracer zugegeben (Dosierapparat, Fa. Hamilton, über Fa. G. Schmidt, Hamburg-Sasel). Nach Öffnen des Säulenschlusses und Einsinken des Inkubationsgemisches in das Gel werden die Säulen mit 4 ml Natriumphosphat-EDTA-Puffer pH 7,4 umgepuffert (Repetierspritze, Fa. Cornwall, über Fa. Empfenzeder, München) und das Eluat verworfen. Dann werden 0,5 ml  $T_3$ -Antikörperlösung aufgetragen und die Säulen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Stunden wird der  $T_3$ -Antikörper-gebundene Anteil durch Auftragen von 4 ml Natriumphosphat-EDTA-Puffer pH 7,4 eluiert und gleich in den Zählröhrchen gesammelt. Darauf werden 0,4 ml  $T_4$ -Antikörperlösung aufgetragen und die Säulen wiederum zwei Stunden inkubiert. Der  $T_4$ -Antikörper-gebundene Anteil wird ebenfalls mit 4 ml Puffer eluiert und in den Zählröhrchen gesammelt. Der auf der Säule verbliebene, ungebundene Anteil von  $T_3$  und  $T_4$  wird mit 4 ml Polyvinylpyrrolidon-Lösung eluiert und verworfen. Nach Spülen mit 0,15 mol/l NaCl in 0,05 mol/l NaOH sind die Säulen für einen neuen Durchgang vorbereitet.

Nach diesem Verfahren wurden bis zu 120 Säulen parallel behandelt.

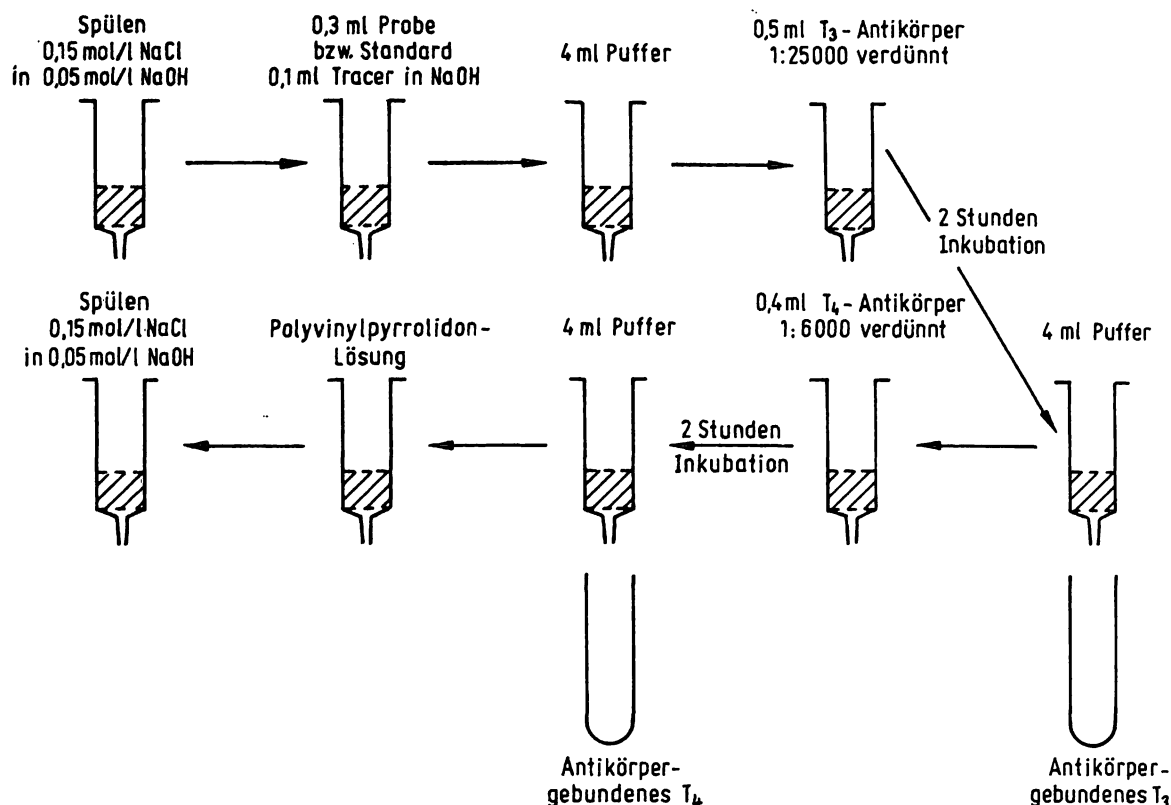


Abb. 1. Schematische Darstellung zur Durchführung der simultanen, radioimmunologischen Bestimmung der Schilddrüsenhormone Thyroxin ( $T_4$ ) und Trijodthyronin ( $T_3$ ) im Urin.

Erklärung siehe Text.

## Ergebnisse

### Analytik

Bei Verwendung der beschriebenen Antikörperversdünnungen waren beim Nullstandard 50% des  $T_4$ -Tracers und 70% des  $T_3$ -Tracers gebunden ( $B_0$ ). Die untere Nachweisgrenze ( $\bar{x}_{B_0} - 3s$ ) lag für  $T_3$  bei 20 pg pro Ansatz und für  $T_4$  bei 60 pg pro Ansatz. Als Maß für die Steilheit der Kalibrierkurve lag der Wert für 50% des bei  $B_0$  gebundenen Tracers (50% intercept) bei 200 pg  $T_3$  pro Ansatz bzw. 600 pg  $T_4$  pro Ansatz. Da bei dieser Methode eine chromatographische Tracerreinigung bei dem Extraktionsschritt erfolgte, war die unspezifische Bindung praktisch null.

Die beiden Bestimmungen störten sich gegenseitig nicht: Die Kreuzreaktionen von  $T_4$  im  $T_3$ -Nachweis von 0,4% bzw. die von  $T_3$  im  $T_4$ -Nachweis von 1,4% waren bei der Messung von Urinproben zu vernachlässigen.

Da sich die beiden Nachweisreaktionen gegenseitig nicht beeinflussen, wurde zur Bestimmung der Wiederfindung von kalten Standards Thyroxin und Trijodthyronin simultan einer Urinprobe zugesetzt. Die mittlere Wiederfindung von kalten Standards in Urinproben lag für den  $T_3$ -Radioimmunoassay bei  $107 \pm 8\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $N = 9$ ), für den  $T_4$ -Radioimmunoassay bei  $102 \pm 8\%$ . Verdünnungsreihen von Urin in Wasser oder Puffer lagen bei beiden Methoden auf den Kalibrierkurven ( $T_3$ :  $r = 0,97$ ,  $b = 1,06$ ;  $T_4$ :  $r = 0,97$ ,  $b = 1,01$ ).

Der Intraassay-Variationskoeffizient lag bei der  $T_3$ -Bestimmung bei 8,6% ( $N = 9$ ) und bei der  $T_4$ -Bestimmung bei 9,1%.

Da andere Autoren eine Instabilität der Schilddrüsenhormone im Urin bei Lagerung nachweisen konnten (3), wurde zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag Kontrollserum in entsprechender Verdünnung eingesetzt. Der Interassay-Variationskoeffizient wurde über acht Monate ermittelt und zwar durch ein 1:3 verdünntes Kontrollserum für  $T_3$  und ein 1:30 verdünntes Kontrollserum für  $T_4$ : er lag für  $T_3$  bei 20,1% bzw. für  $T_4$  bei 10,6%. Ein Vergleich der mit dieser Methode gemessenen  $T_3$ -Werte verschiedener Urinproben mit dem Ergebnis bei Bestimmung dieser Urinproben durch die Serummethode (5) ergab identische Werte ( $N = 10$ ,  $r = 0,99$ ,  $b = 1,03$ ).

### Stabilität

Im Gegensatz zur Instabilität der Urine bei Raumtemperatur und  $+4^\circ\text{C}$  (3) konnten wir bei sofort tiefgefrorenen Urinproben ( $-17^\circ\text{C}$ ) auch nach 20 Tagen keine Veränderung finden.

### Normalbereich

Die Hormonausscheidung im 24-Stunden-Urin bei zwanzig gesunden Normalpersonen lag für  $T_3$  bei

$1,70 \pm 0,40 \mu\text{g}$  ( $\bar{x} \pm s$ ) und für  $T_4$  bei  $1,44 \pm 0,51 \mu\text{g}$ . Der Quotient der  $T_4/T_3$ -Ausscheidung betrug  $0,85 \pm 0,27$ . Hierbei handelte es sich um 17 Männer im Alter zwischen 23 und 42 Jahren und um 3 Frauen im Alter zwischen 36 und 42 Jahren. Das Körpergewicht betrug  $97 \pm 12\%$  ( $\bar{x} \pm s$ ) des Normalgewichts.

### Tagesrhythmik

Zur Feststellung einer Tagesrhythmik der Hormonausscheidung wurde der Urin bei elf gesunden Normalpersonen über Tag in 3-Stunden-Fractionen (6–9, 9–12, 12–15, 15–18, 18–21 Uhr) und über Nacht in einer 9-Stunden-Fraktion (21–6 Uhr) gesammelt. Es handelte sich hierbei um Bundeswehrangehörige, die um 6.00 Uhr geweckt und während des Tages einer psychologischen Testuntersuchung unterzogen wurden. Hierbei zeigte sich (Abb. 2), daß die Thyroxinausscheidung im Mittel ab 9 Uhr um 70% gegenüber der Ausscheidung in der Nacht ansteigt und über den Tag bis 21 Uhr konstant bleibt ( $p < 0,005$ ). Die Ausscheidung von 6–9 Uhr war nicht signifikant höher als in der Nachtperiode. Eine ähnliche Tagesperiodik konnte für  $T_3$  nicht nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der Fraktion von 18–21 Uhr, in der die Ausscheidung um etwa 40% über der Nachtperiode lag ( $p < 0,005$ ), unterschieden sich die Urinausscheidungen von  $T_3$  in den einzelnen Fraktionen nicht. In der Nachtperiode lag die mittlere stündliche Ausscheidung von  $T_3$  bei  $63,3 \pm 14,3 \text{ ng}$  und von  $T_4$  bei  $40,5 \pm 15,4 \text{ ng}$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $N = 11$ ).

### Diagnostische Ergebnisse

Zur Beurteilung der diagnostischen Wertigkeit wurde die Hormonausscheidung von Patienten mit Hypothyreose, blander Struma und Hyperthyreose bestimmt (Abb. 3).

Bei der Gruppe der Patienten mit Hypothyreose handelte es sich um zehn Patienten mit primärer und zwei Patienten mit sekundärer Hypothyreose. Obwohl die Serum- $T_4$ -Spiegel aller Patienten ( $15 \pm 12 \mu\text{g/l}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) unterhalb des

Normalbereiches lagen ( $45\text{--}100 \mu\text{g/l } T_4$ ), war die  $T_4$ -Ausscheidung im Urin nur bei fünf Patienten erniedrigt. Der Mittelwert (Tab. 1) war dagegen mit  $0,48 \pm 0,47 \mu\text{g}/24 \text{ h}$  signifikant erniedrigt ( $p < 0,0005$ ). Dagegen fanden wir keinen so deutlichen Unterschied in der  $T_3$ -Exkretion. Der Mittelwert lag mit  $1,30 \pm 0,80 \mu\text{g}/24 \text{ h}$  nur wenig unter dem Mittelwert des Normalkollektivs. Deutlich unterschied sich folglich der Quotient der  $T_4$ -zu  $T_3$ -Ausscheidung, der bei den primären Hypothyreosen mit  $0,41 \pm 0,30$  signifikant gegenüber dem Normalkollektiv erniedrigt war ( $p < 0,0005$ ).

Interessanterweise zeigten die beiden Patienten mit sekundärer Hypothyreose eine normale  $T_4$ -Ausscheidung bei deutlich erniedrigter  $T_3$ -Exkretion. Entsprechend waren die Quotienten aus  $T_4$ - und  $T_3$ -Ausscheidung mit 2,80 und 2,69 deutlich erhöht.

Bei 16 Patienten mit blander Struma lagen die Serum- $T_4$ -Spiegel wie üblich im unteren Normalbereich, die  $T_3$ -Spiegel waren normal (7). Die Werte der Hormonausscheidung im Urin lagen zwischen denen der Normalpersonen und der primären Hypothyreosen (Tab. 1). Der  $T_4/T_3$ -Quotient war signifikant gegenüber dem Normalkollektiv erniedrigt ( $p < 0,0005$ ).

Bei allen Patienten mit Hyperthyreose ( $N = 16$ ) lag die  $T_3$ -Ausscheidung über dem Normalbereich. Bei den fünf Patienten mit  $T_3$ -Hyperthyreose (1) war die  $T_4$ -Ausscheidung normal bzw. in einem Fall mäßig erhöht. Bei klassischen Hyperthyreosen mit erhöhten Serum- $T_4$ -Werten war auch die  $T_4$ -Exkretion erhöht (Abb. 3, Tab. 1). Der  $T_4/T_3$ -Quotient war bei den klassischen Hyperthyreosen im Mittel nicht signifikant erhöht, bei den  $T_3$ -Hyperthyreosen dagegen schwach signifikant erniedrigt.

Bei Patienten mit persistierender Thyrotropin-Suppression, d. h. Patienten, bei denen nach Behandlung einer Hyperthyreose normale oder schon erniedrigte  $T_4$ - und  $T_3$ -Werte im Serum mit supprimierten, Thyroliberin-refraktären Thyrotropin-Spiegeln einhergehen (1, 8), interessiert die Frage, ob diese Suppression

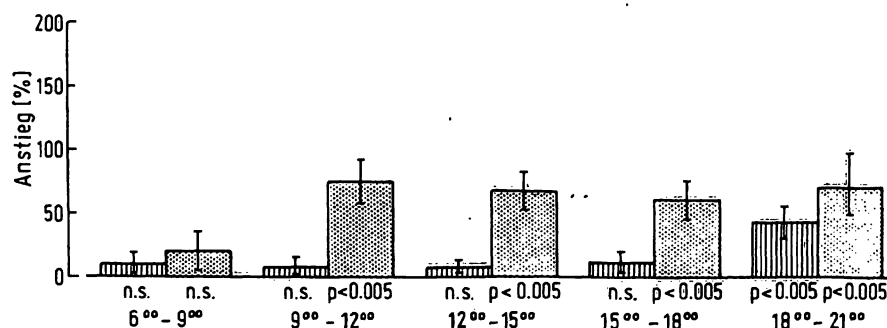


Abb. 2. Tagesrhythmik der  $T_3$ - und  $T_4$ -Ausscheidung im Urin. Aufgezeigt sind die mittleren prozentualen Anstiege ( $\bar{x} \pm s$ ,  $N = 11$ ) der Ausscheidung von  $T_3$  (linke, schraffierte Säulen) und  $T_4$  (rechte, gepunktete Säulen) in den einzelnen Sammelperioden, die aus dem individuellen Anstieg gegenüber der Nachtperiode (= 100%) berechnet wurden. Wegen der längeren nächtlichen Urinsammelperiode wurden die Ausscheidungen pro Stunde berechnet.

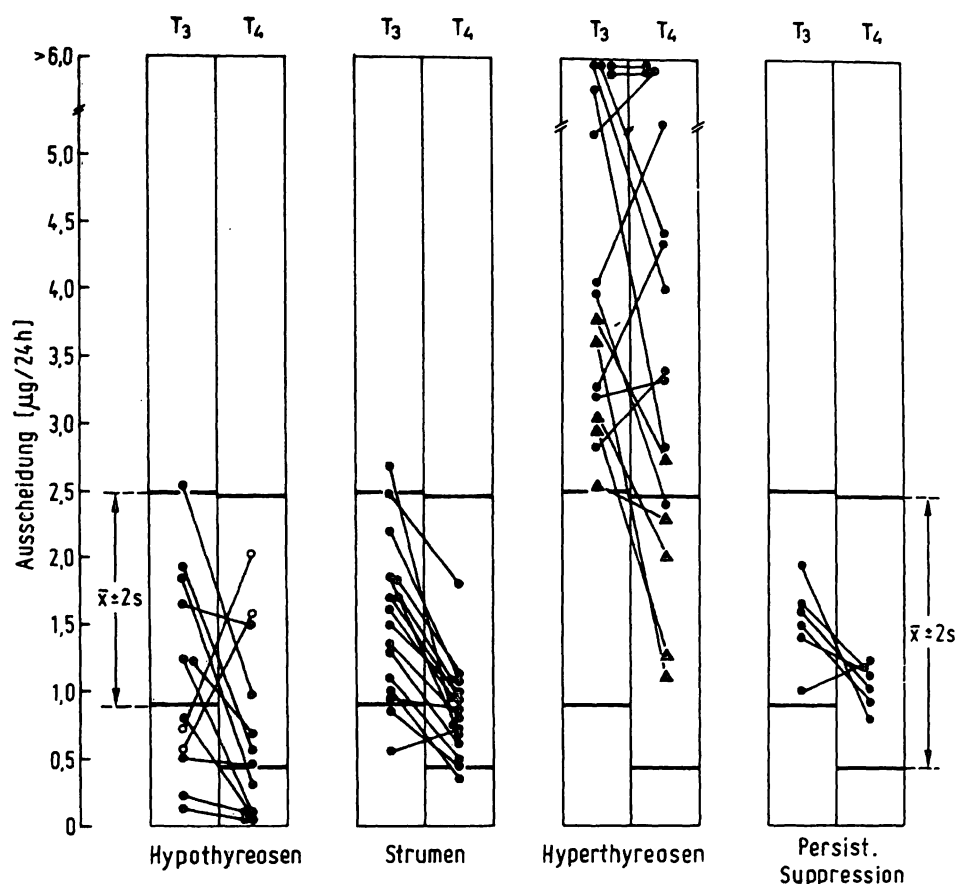


Abb. 3. T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin bei Patienten mit Hypothyreose, Struma, Hyperthyreose und persistierender Suppression.

Aufgezeichnet sind die Einzelwerte der Hormonausscheidung in 24 Stunden. Die T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Ausscheidungen der einzelnen Patienten sind miteinander verbunden. Gesondert gekennzeichnet sind Patienten mit sekundärer Hypothyreose (○—○) und T<sub>3</sub>-Hyperthyreose (▲—▲). Ferner ist der Normalbereich ( $\bar{x} \pm 2s$ ) der Hormonausscheidung im Urin eingezeichnet.

Tab. 1. Schilddrüsenhormonausscheidung im Urin bei Patienten mit Schilddrüsenfunktionsstörungen.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Ausscheidung im 24 Stunden-Urin, sowie die daraus berechneten mittleren T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>-Quotienten.

	N	T <sub>3</sub> [µg/d] $\bar{x} \pm s$	P	T <sub>4</sub> [µg/d] $\bar{x} \pm s$	P	T <sub>4</sub> /T <sub>3</sub> $\bar{x} \pm s$	P
Primäre Hypothyreosen	10	1,30 ± 0,86	< 0,05	0,48 ± 0,47	< 0,0005	0,41 ± 0,30	< 0,0005
Sekundäre Hypothyreosen	2	0,65 ± 0,10	< 0,005	1,80 ± 0,33	n. s.	2,75 ± 0,08	< 0,0005
Blande Strumen	16	1,54 ± 0,59	n. s.	0,85 ± 0,34	< 0,0005	0,59 ± 0,23	< 0,0005
„Klassische“ Hyperthyreosen	11	5,86 ± 3,68	< 0,0005	5,62 ± 3,88	< 0,0005	1,01 ± 0,43	n. s.
T <sub>3</sub> -Hyperthyreosen	5	3,17 ± 0,50	< 0,0005	1,88 ± 0,69	n. s.	0,61 ± 0,24	< 0,05
Persistierende Suppression	6	1,53 ± 0,32	n. s.	1,05 ± 0,17	< 0,05	0,73 ± 0,27	n. s.
Normalbereich	20	1,70 ± 0,40		1,44 ± 0,51		0,85 ± 0,27	

auf einen erhöhten Umsatz der Schilddrüsenhormone zurückzuführen ist. Bei sechs hier untersuchten Patienten mit definitionsgemäß nicht erhöhten Schilddrüsenhormonspiegeln im Serum ( $\bar{T}_3: 1274 \pm 233$  ng/l,  $\bar{T}_4: 53 \pm 15$  µg/l,  $\bar{x} \pm s$ ) und nicht stimulierbaren Thyrotropin-Spiegeln war die T<sub>4</sub>- und T<sub>3</sub>-Ausscheidung normal (Abb. 3, Tab. 1).

## Diskussion

Der gefundene Normalbereich für die T<sub>3</sub>-Ausscheidung in 24 Stunden entspricht etwa den in der Literatur beschriebenen Werten (6, 9, 10, 11). Die Werte der T<sub>4</sub>-Ausscheidung sind allerdings deutlich niedriger als bei anderen Autoren (12, 13, 14, 15, 16). Als eine Ursache

für falsch hohe  $T_4$ -Werte im Urin wurde bereits von *Shakespeare* (3) und *Black* (15) die Mitbestimmung der Schilddrüsenhormonglucuronide nach hydrolytischer Spaltung während der Extraktion im sauren Milieu diskutiert.

Die Ergebnisse von *Burke* (6) über die hydrolytische Spaltung der Schilddrüsenhormonglucuronide durch Säure konnten qualitativ bestätigt werden. Mit der von uns entwickelten Methode konnte nach vorgeschalteter saurer Hydrolyse ein Anstieg der  $T_3$ -Konzentrationen um durchschnittlich 69% und der  $T_4$ -Konzentrationen um 38% beobachtet werden. Zudem lagen die Urinverdünnungskurven auf der Kalibrierkurve. Aus diesen Befunden muß man schließen, daß bei unserer Bestimmung die glucuronidierten Hormone, wie bei *Burke* (6), nicht mitbestimmt werden.

Im Gegensatz zu anderen Bestimmungsmethoden (3, 4) wird unser Nachweis – infolge der alkalischen Extraktion – durch Proteine nicht gestört. Es wird somit die gesamte Hormonausscheidung gemessen, wobei nicht unterschieden werden kann, wieviel des Hormons an Protein gebunden ist. Das proteingebundene ausgeschiedene Hormon ist normalerweise vernachlässigbar gering, spielt jedoch bei einer Proteinurie eine wesentliche Rolle. Wir fanden bei einem Patienten mit nephrotischem Syndrom und einer Proteinurie von 10 g pro Tag eine Hormonausscheidung von  $1,6 \mu\text{g } T_3$  und von  $14,7 \mu\text{g } T_4$  in 24 Stunden. Infolge der höheren Proteinbindung von  $T_4$  wurde bei diesem Patienten nur  $T_4$  vermehrt ausgeschieden (vgl. 4).

Irr. Gegensatz zu anderen Autoren (3, 9, 14) fanden wir bei der Mehrzahl der untersuchten Probanden im Verhältnis zu  $T_4$  eine höhere  $T_3$ -Ausscheidung im Urin. Da aber  $T_4$  im Urin von den anderen Arbeitsgruppen fast ausschließlich mit der kompetitiven Proteinbindungsanalyse bestimmt wurde und hierbei eine Kreuzreaktion mit  $T_3$  zwischen 37 und 45% besteht (3), sind die hohen Werte zum Teil auch methodisch zu erklären. Ob die bei uns gefundene relative  $T_3$ -Mehrausscheidung im Urin auch als Folge des alimentären Jodmangels in der Bundesrepublik Deutschland (17) zu betrachten ist, muß noch geklärt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung über Tagesperiodik der Hormonausscheidung decken sich mit den Resultaten anderer Autoren (3, 9, 11). Da nur die  $T_4$ -Ausscheidung tagsüber erhöht ist, während die  $T_3$ -Exkretion nahezu konstant bleibt, liegt die Vermutung nahe, daß dieser Effekt auf eine vermehrte Proteinausscheidung am Tag zu beziehen ist (3). Da aber die Katecholamine einerseits eine ähnliche Tagesrhythmik (18) zeigen, andererseits aber Katecholamine eine gesteigerte Proteinurie

bewirken (19, 20), könnte hier ein kausaler Zusammenhang bestehen.

Wie auch andere Autoren (3, 16) fanden wir bei den Patienten mit primärer Hypothyreose eine signifikant geringere Thyroxinausscheidung im Urin, wenngleich auch die Werte zum Teil noch im 2s-Bereich des Normalkollektivs lagen. Die gegenüber den Normalpersonen nur wenig verringerte  $T_3$ -Exkretion entspricht der aus Serumbestimmungen bekannten  $T_3$ -Restsekretion bei primärer Hypothyreose durch erhöhte Thyrotropin-Stimulation (21).

Zwei Patienten mit sekundärer Hypothyreose zeigten diesen Effekt der  $T_3$ -Restsekretion nicht (Abb. 3), vielmehr lag hier die  $T_3$ -Ausscheidung deutlich unterhalb des Normalkollektivs, während die  $T_4$ -Exkretion im Normalbereich lag (Tab. 1).

Die Patienten mit endemischer Struma hatten eine noch normale  $T_3$ -Ausscheidung, aber eine im Mittel deutlich verminderte  $T_4$ -Exkretion, eine Konstellation, die aus Serummessungen als eine kompensatorische  $T_3$ -Mehrssekretion der Schilddrüse bei alimentärem Jodmangel bekannt ist (7, 21).

Bei den Patienten mit Hyperthyreose fanden wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren (3, 22, 23) in allen Fällen eine erhöhte  $T_3$ -Exkretion. Die Thyroxinausscheidung lag dagegen nur bei den Patienten mit klassischer Hyperthyreose, aber nicht bei  $T_3$ -Hyperthyreose oberhalb des Normalbereichs.

Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit fehlendem Thyrotropin-Anstieg nach Thyroliberin-Stimulation bei normalen Schilddrüsenhormonspiegeln im Serum nach Behandlung einer Hyperthyreose (sog. persistierende Thyrotropin-Suppression) keine erhöhte Ausscheidung der Hormone im Urin. Erhöhte freie Schilddrüsenhormonspiegel im Serum als Ursache für diese Thyrotropin-Suppression sind nach diesen Ergebnissen unwahrscheinlich, zumal eine gute Korrelation zwischen Urinausscheidung von  $T_4$  und freiem Thyroxin im Serum nachgewiesen wurde (24).

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (3, 11) kann ausgesagt werden, daß die Schilddrüsenhormonbestimmung für die Routinediagnostik gegenüber der Hormonbestimmung im Serum keine wesentlichen Vorteile bringt. Die Schilddrüsenhormonbestimmung im Urin liefert jedoch einen integrierenden Parameter für den Gehalt an freien Schilddrüsenhormonen im Serum. Damit könnten schnelle und kurzfristige Veränderungen der Proteinbindung der Schilddrüsenhormone über Zeiträume erfaßt werden, in denen eine Blutabnahme nicht möglich ist, zum Beispiel bei Belastungen.

## Literatur

1. Pickardt, C. R., Horn, K. & Scriba, P. C. (1972), *Internist* 13, 133–140.
2. Herrmann, J. & Kruskemper, H. L. (1971), *diese Z.* 9, 320–323.
3. Shakespear, R. A. & Burke, C. W. (1976), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42, 494–503.
4. Burke, C. W. & Shakespear, R. A. (1976), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42, 504–513.
5. Horn, K., Henner, J., Müller, O. A. & Scriba, P. C. (1975), *diese Z.* 13, 173–178.
6. Burke, C. W., Shakespear, R. A. & Fraser, T. R. (1972), *Lancet* II, 1177–1179.
7. Horn, K., Koeppen, D., Pickardt, C. R. & Scriba, P. C. (1975), *Klin. Wochenschr.* 53, 94–95.
8. Pickardt, C. R. & von zur Mühlen, A. (1975), *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. 193, 178–180.
9. Chan, V. (1974), *Ann. Clin. Biochem.* 11, 120–129.
10. Loos, U., Wagner, H., Bellstädt, G., Heine, M. & Rothenbuchner, G. (1975), *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. 199, 174.
11. Hüfner, M. & Hesch, R. D. (1973), *Lancet* I, 101–102.
12. Chan, V. & Landon, J. (1972), *Lancet* I, 4–6.
13. Sulman, F. G., Tal, E., Pfeifer, Y. & Superstine, E. (1975), *Horm. Metab. Res.* 7, 424–428.
14. Rastogi, G. K., Sawhney, R. C., Sinha, M. K., Thomas, Z. & Devi, P. K. (1974), *Obstet. Gynecol.* 44, 176–180.
15. Black, E., Griffiths, S., Hoffenberg, R. & Leatherdale, B. (1973), *Lancet* I, 152–153.
16. Ishihara, A., Loos, U., Rothenbuchner, G. & Pfeiffer, E. F. (1974), *Acta Endocrinol. (Copenhagen)*, Suppl. 184, 79.
17. Habermann, J., Heinze, H. G., Horn, K., Kantlehner, R., Marschner, I., Neumann, J. & Scriba, P. C. (1975), *Deut. Med. Wochenschr.* 100, 1937–1945.
18. Wissner, H., Doerr, P., Stamm, D., Fatranka, M., Giedke, H. & Wever, R. (1973), *Klin. Wochenschr.* 51, 242–246.
19. Latham, W. (1956), *J. Clin. Invest.* 35, 1277–1285.
20. King, E. & Baldwin, D. S. (1956), *Amer. J. Med.* 20, 217–224.
21. Horn, K. (1976), Trijodthyronin (T<sub>3</sub>). Zur Bestimmung und pathophysiologischen Bedeutung Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien.
22. Chan, V., Besser, G. M., Landon, J. & Ekins, R. P. (1972), *Lancet* II, 253–256.
23. Rogowsky, P., Siersbaek-Nielsen, K. & Møhlholm Hansen, J. (1975), *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* Suppl. 199, 342.
24. Burke, C. W. & Eastman, C. J. (1974), *Br. Med. Bull.* 30, 93–99.

Dr. med. J. Habermann  
P. D. Dr. med. K. Horn  
Prof. Dr. med. P. C. Scriba  
II. Medizinische Klinik der Universität  
Ziemssenstraße 1  
D-8000 München 2

Prof. Dr. med. G. Ulbrecht  
Flugmedizinisches Institut  
der Luftwaffe  
D-8080 Fürstenfeldbruck